

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-310268
(P2003-310268A)

(43)公開日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		48/00	4 B 0 2 4
48/00		A 6 1 P 13/12	4 B 0 6 3
A 6 1 P 13/12		43/00	1 0 5 4 C 0 8 4
43/00	1 0 5	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 20 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-121315(P2002-121315)

(22)出願日 平成14年4月23日(2002.4.23)

(71)出願人 597142387

黒川 清

東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401

(71)出願人 597142376

宮田 敏男

神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号

(72)発明者 黒川 清

東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401号

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 転写調節配列およびその利用

(57)【要約】

【課題】 転写調節DNAを提供することを課題とする。

【解決手段】 MEGSIN遺伝子上流約4.0kbを含むゲノムDNA領域を単離し、その塩基配列を決定した。また、このゲノムDNA領域において、転写を正に制御する領域を特定した。さらに、この領域においてAP-1結合モチーフが、転写活性を正に調節する活性を示すことを見出した。この配列を欠失させたり、または部位特異的変異導入法によりこの配列に変異を導入すると、転写活性が著しく低下した。本発明の転写調節DNAは、メサンギウム細胞特異的な転写制御配列として有用である。また該DNAは、MEGSIN遺伝子の発現を制御する転写因子および薬剤のスクリーニングにも利用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記（a）または（b）に記載のDNA。

（a）配列番号：1に記載の塩基配列のCTGATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列を含む単離されたDNA。

（b）配列番号：1に記載の塩基配列のCTGATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列において、該CTGATTCAC以外の1または複数の塩基を置換、欠失、および/または挿入した塩基配列を含む単離されたDNAであって、転写を正に制御する活性を有するDNA。

【請求項2】 請求項1に記載のDNAを転写制御領域に挿入する工程を含む、転写を正に制御する方法。

【請求項3】 請求項1に記載のDNAを含む転写制御領域から、CTGATTCAC配列を欠損させる工程を含む、転写を負に制御する方法。

【請求項4】 請求項1に記載のDNAに結合する化合物の検出方法であって、（a）該DNAを被検化合物と接触させる工程、（b）該DNAと該被検化合物との結合を検出する工程、を含む方法。

【請求項5】 請求項1に記載のDNAに結合する化合物のスクリーニング方法であって、（a）該DNAを被検化合物と接触させる工程、（b）該DNAと該被検化合物との結合を検出する工程、（c）該DNAと結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項6】 請求項1に記載のDNAとAP-1との結合に及ぼす化合物の効果を評価する方法であって、（a）被検化合物を含む試料の存在下、該DNAとAP-1を接触させる工程、（b）該DNAと該AP-1との結合を検出する工程、（c）該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該AP-1との結合と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法。

【請求項7】 請求項1に記載のDNAとAP-1との結合を調節する化合物のスクリーニング方法であって、（a）被検化合物を含む試料の存在下、該DNAとAP-1を接触させる工程、（b）該DNAと該AP-1との結合を検出する工程、（c）該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該AP-1との結合と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、（d）該DNAと該AP-1との結合を調節する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項8】 請求項1に記載のDNAの下流に機能的に遺伝子が連結された組み換えDNA。

【請求項9】 転写活性に及ぼす被検化合物の効果を評価する方法であって、（a）被検化合物を含む試料の存在下、請求項8に記載のDNAを発現させる工程、（b）該発現を検出する工程、（c）該発現を、被検化合物の非存在下における請求項8に記載のDNAの発現と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法。

【請求項10】 転写活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、（a）被検化合物を含む試料

の存在下、請求項8に記載のDNAを発現させる工程、

（b）該発現を検出する工程、（c）該発現を、被検化合物の非存在下における請求項8に記載のDNAの発現と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、（d）該発現を調節する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項11】 請求項5、7、または10に記載の方法により選択される化合物を含む転写調節剤。

【請求項12】 請求項1に記載のDNAを有効成分とする転写調節剤。

【請求項13】 MEGSIN遺伝子の転写調節剤である、請求項11または12に記載の転写調節剤。

【請求項14】 請求項5、7、または10に記載の方法により選択される化合物あるいは請求項1に記載のDNAを含む、メサンギウム細胞増殖調節剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の転写調節に関与するDNAに関する。本発明のDNAは、遺伝子治療などの分野に応用が可能である。

【0002】

【従来の技術】体内の60兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノムDNAを有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型で特異的に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

【0003】メサンギウム (mesangium) は、糸球体の毛細管係蹄の小葉中心部に位置し、各小葉を結びつける芯となる組織である。メサンギウムは糸球体基底膜に覆われており、毛細管腔とは内皮細胞によって隔てられている細胞 (メサンギウム細胞: mesangial cell) と3層からなる糸球体基底膜の中の内透明層と連続している無形物質 (メサンギウム基質: mesangial matrix) から構成されている。

【0004】メサンギウム細胞は、糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしていることが知られており、また、糸球体腎炎や糸球体硬化症などの糸球体疾患の発症における主要な要因であると考えられている。そして、メサンギウム細胞は、各種腎炎において障害の標的となっている。例えば、メサンギウム細胞の増殖や細胞外メサンギウム基質の蓄積は、末期腎不全の2大原因である慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症のような種々の糸球体障害を有する患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている [D.Schlondorff, Kidney Int., 49, 1583-1585 (1996); R.B. Sterzel and H.D. Rupperecht, Glomerular mesangial cells. In: Neilson, E.G. Couser, W.G. eds., "Immunologic Renal Diseases", Philadelphia: Lippincott-Raven, pp595-626 (1997)]. 従って、メサンギウム細胞で特異的に発現し

ている遺伝子を見だし、その発現の調節機構を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

【0005】ところで、本発明者は、大規模DNA配列決定およびデータベース解析により、メサンギウム細胞で特に強く発現する遺伝子として、MEGSINと命名した遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定した。そして、MEGSINの全長cDNAクローンがコードする380個のアミノ酸からなる新規蛋白質（ヒトMEGSIN）の配列を決定した。さらに、Swiss Protデータベースを用いてFASTAプログラムによるアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、ヒトMEGSINが、SERPIN（セリンプロテアーゼインヒビター）スーパーファミリー [R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci., 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52, 527 (1987); E. K. O. Kruithof et al., Blood, 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem., 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell, FEBS Lett., 315, 105 (1993)] に属する蛋白質であることを見出した [T. Miyata et al., J. Clin. Invest., 120, 828-836 (1998); W099/15652]。

【0006】ヒトMEGSINは、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは発現が弱く、メサンギウム細胞で特に強く発現している（即ち、ヒトMEGSIN遺伝子の発現はメサンギウム細胞に特異性を有する）。また、IgA腎症患者や糖尿病性腎症患者と健常人とで腎臓組織中のMEGSINの発現量を比較すると、IgA腎症患者や糖尿病性腎症患者においてMEGSINが有意に発現量が多い [D. Suzuki et al., J. Am. Soc. Nephrol., 10, 2606-2613 (1999); W000/57189]。また、ラットを用いたメサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルにおいて、この遺伝子の発現量の上昇が認められた (W001/48019)。また、MEGSINのトランスジェニックマウスでは、メサンギウム細胞を主体とする著明な細胞増殖、メサンギウム基質の増生、並びに免疫グロブリンや補体から成る免疫複合体の沈着亢進が認められ、典型的なメサンギウム増殖性糸球体腎炎の症状を呈することから、MEGSIN遺伝子の発現の亢進が、メサンギウム増殖性糸球体腎炎に貢献していると考えられる (W001/24628)。

【0007】このように、MEGSIN遺伝子の発現は、腎疾患に深く関与している可能性があることから、MEGSIN遺伝子の発現調節機構の実態を明らかにし、ヒトMEGSINの生体内における機能の解明やその変異によって引き起こされる遺伝性疾患などへの診断、治療に有用な転写制御配列の提供、あるいは腎メサンギウム細胞に特異的に発現する転写制御配列を提供することが望まれていた。

【0008】一方、ヒトMEGSINが属するSERPINスーパーファミリーは、一次構造上相互に高い相同性を有するこ

とから、進化上共通の祖先蛋白質から分岐したと考えられている。すなわち、アミノ酸配列上の変異アミノ酸数

[K. Suzuki et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso, 34, 949-962 (1989)] や染色体遺伝子構造に基づいて作製された進化系統樹 [J. J. Bao et al., Biochem., 26, 7755 (1987)] の解析の結果、SERPINスーパーファミリーは、種々の高等脊椎動物とともに500万年以上にわたって進化してきたことが示されている。しかしながら、MEGSIN遺伝子は、糸球体メサンギウム細胞に特異的に発現するという点で極めて特徴的である。

【0009】また最近、イオンチャンネルや輸送に係わる遺伝子が、腎臓に特異的に発現することが報告されている [S. J. Lolait et al., Nature, 357, 336-339 (1992); Y. Kanai et al., J. Clin. Invest., 93, 397-404 (1994); S. Uchida et al., J. Biol. Chem., 268, 3821-3824 (1993); S. Adachi et al., J. Biol. Chem., 269, 17677-17683 (1994); K. Fushimi et al., Nature, 361, 549-552 (1993); G. Gamba et al., J. Biol. Chem., 269, 17713-17722 (1994)]。しかしながら、これらの遺伝子は、尿細管上皮細胞に局在しており、糸球体メサンギウム細胞では発現していない。従って、MEGSIN遺伝子の転写制御配列およびMEGSIN遺伝子の転写に関与する転写因子を解明することにより、細胞型依存的な遺伝子発現機構に関する重要な情報を得ることができる。さらにこのようにして得られた情報は、分子遺伝学や遺伝子導入における標的細胞にも応用することができる。

【0010】本発明者らは、これまでにMEGSIN遺伝子の転写開始点からその上流域約1.2kbpの付近の転写活性に関わるDNA配列について検討している (W000/43528)。しかしながら、本発明においてMEGSIN遺伝子のプロモーター領域中に見出された配列が転写誘導に関与しているかは全く示唆されていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、転写調節配列を含むDNAおよびその利用を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らはMEGSIN遺伝子の発現調節機構を解明するために、これまで単離されていなかったMEGSIN遺伝子上流（5'側）約4.0 kbを含むゲノムDNAの塩基配列を新たに決定した。また本発明者らは、培養ヒトメサンギウム細胞から調製したmRNAを用いて、プライマーエクステンション法によりヒトMEGSIN mRNAの転写開始点を決定した。プライマーエクステンション法は、転写開始点より下流に存在し、転写されるRNAと相補性を持つような一本鎖DNAをプライマーとし、5'末端をラベルした後、RNAとハイブリッド形成させ逆転写酵素を用いて転写開始点まで伸長させ、得られた断片の大きさにより同じプライマーを用いたゲノムDN

Aのシーケンスのラダーと比較し、転写開始点を決定する方法である。この方法により本発明者らは、ヒトMEGSIN遺伝子の主要な転写開始点を同定することに成功した。

【0013】同定された転写開始点の上流約35bpの部位にはプロモーター配列であるTATAボックス(TATA box)が存在し、さらにその上流には、AP-1、oct-1等の転写制御部位となり得る転写制御配列が存在することが判明した。この転写制御配列を含むMEGSIN遺伝子上流域約4.0 kbの領域を段階的に欠失させたDNAを用いてルシフェラーゼレポーター構築物を作製し、ヒトメサングウム細胞および類表皮癌細胞株A431を用いてそれぞれの構築物のプロモーター活性を測定した。その結果、ヒトMEGSIN遺伝子の転写開始点から-240~-72の領域に、転写を正に制御する配列が存在することを突きとめた。

【0014】転写制御に関与する配列をさらに詳細に同定するため、-179~+130から-72~+130の間で10 bp刻みにMEGSINプロモーター領域を含むレポーター構築物を作製し、その転写活性を検討した結果、-121~+130と-99~+130の間で転写活性が激減することが判明した。-121~-99の間のモチーフを検索したところ、AP-1、oct-1、Brn-2/TCF-11 等に高スコアの配列が見つかった。当該配列を含む塩基配列 55bp (-85~-139) を欠失させたコンストラクトを作製して転写活性を検討した結果、この55 bpを欠失させたコンストラクト(-85~-139欠失構築物)では転写活性が完全に低下した。

【0015】この配列中に含まれるAP-1、oct-1、またはTCF-11 のうち転写調節に役割を持つ配列を同定するため、AP-1、oct-1、またはTCF-11 のそれぞれの変異を含んだコンストラクトを作製し、これらの転写活性を検討した。その結果、oct-1ミュータントでは転写活性に変動が見られないのに対し、AP-1ミュータントでは約50%の転写活性の低下が見られた。さらに、AP-1結合モチーフの部分のみを欠失させたコンストラクトについて同様の検討を行うと、ミュータントと同様に転写活性が約50%低下することが判明した。このように本発明者らは、ヒトMEGSIN遺伝子の転写開始点から上流-120~-112に存在するAP-1結合配列 CTGATTCAC を含むDNAは転写活性を正に制御するために重要な機能を有しており、ヒトMEGSIN遺伝子の発現制御に本質的な役割を果たすことを実証した。

【0016】以上のように本発明者らは、MEGSIN遺伝子のプロモーター領域において転写制御に関与する新たなDNA配列を同定することに成功した。この配列を含むDNAを用いれば、例えばメサングウム細胞など特定の細胞で外来遺伝子を発現させる発現ベクターを開発することが可能となる。また、このDNAと転写因子との結合を調節する化合物のスクリーニングを通して、MEGSIN遺伝子等の発現を調節する薬剤を得ることもできる。上記のように、MEGSIN遺伝子の発現の亢進はメサングウム細胞増殖

性の腎症を引き起こすことが知られており、MEGSINの発現を抑制することができる薬剤は腎疾患に対する医薬としての利用が期待される。

【0017】本発明は転写調節配列を含むDNAおよびその利用に関し、より具体的には(1)下記(a)または(b)に記載のDNA、(a)配列番号:1に記載の塩基配列のCTGATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列を含む単離されたDNA、(b)配列番号:1に記載の塩基配列のCTGATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列において、該CTGATTCAC以外の1または複数の塩基を置換、欠失、および/または挿入した塩基配列を含む単離されたDNAであって、転写を正に制御する活性を有するDNA、(2)(1)に記載のDNAを転写制御領域に挿入する工程を含む、転写を正に制御する方法、(3)(1)に記載のDNAを含む転写制御領域から、CTGATTCAC配列を欠損させる工程を含む、転写を負に制御する方法、(4)(1)に記載のDNAに結合する化合物の検出方法であって、(a)該DNAを被検化合物と接触させる工程、(b)該DNAと該被検化合物との結合を検出する工程、を含む方法、(5)(1)に記載のDNAに結合する化合物のスクリーニング方法であって、(a)該DNAを被検化合物と接触させる工程、(b)該DNAと該被検化合物との結合を検出する工程、(c)該DNAと結合する化合物を選択する工程、を含む方法、(6)(1)に記載のDNAとAP-1との結合に及ぼす化合物の効果を評価する方法であって、(a)被検化合物を含む試料の存在下、該DNAとAP-1を接触させる工程、(b)該DNAと該AP-1との結合を検出する工程、(c)該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該AP-1との結合と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法、(7)(1)に記載のDNAとAP-1との結合を調節する化合物のスクリーニング方法であって、(a)被検化合物を含む試料の存在下、該DNAとAP-1を接触させる工程、(b)該DNAと該AP-1との結合を検出する工程、(c)該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該AP-1との結合と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、(d)該DNAと該AP-1との結合を調節する化合物を選択する工程、を含む方法、(8)(1)に記載のDNAの下流に機能的に遺伝子が連結された組み換えDNA、(9)転写活性に及ぼす被検化合物の効果を評価する方法であって、(a)被検化合物を含む試料の存在下、(8)に記載のDNAを発現させる工程、(b)該発現を検出する工程、(c)該発現を、被検化合物の非存在下における(8)に記載のDNAの発現と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法、(10)転写活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被検化合物を含む試料の存在下、(8)に記載のDNAを発現させる工程、(b)該発現を検出する工程、(c)該発現を、被検化合物の非存在下における(8)に記載のDNAの発

現と比較することにより、被検化合物の効果を評価する工程、(d)該発現を調節する化合物を選択する工程、を含む方法、(11)(5)、(7)、または(10)に記載の方法により選択される化合物を含む転写調節剤、(12)(1)に記載のDNAを有効成分とする転写調節剤、(13)MEGSIN遺伝子の転写調節剤である、(11)または(12)に記載の転写調節剤、(14)(5)、(7)、または(10)に記載の方法により選択される化合物あるいは(1)に記載のDNAを含む、メサングウム細胞増殖調節剤、に関する。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明は、配列番号：1に記載の塩基配列の少なくとも15塩基の連続した塩基配列を含む単離されたDNAであって、該連続した塩基配列中にCTGATTCAC（配列番号：2）を含むDNAを提供する。本発明者は、ヒトMEGSIN遺伝子の転写開始点の上流領域に存在するCTGATTCAC配列が、下流に連結された遺伝子の転写を正に制御する活性を有することを見出した。この配列を含む本発明のDNAは、転写調節エレメントとして有用である。さらに本発明のDNAは転写因子の結合アクセシに有用である。

【0019】本発明のDNAは、天然のDNAまたは合成DNAであってよい。天然のDNAは、例えばMEGSIN cDNAまたはMEGSIN遺伝子上流領域のゲノムDNA断片などをプローブとして、ヒトおよびその他の哺乳動物などのゲノムDNAから、ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングにより所得することができる。また、MEGSIN cDNAまたはゲノムDNAの配列を基に作成したプライマーを利用してヒトや他の動物のゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことにより単離することができる。DNA断片中に存在するMEGSIN遺伝子およびその上流領域のDNAは、例えば、特開平6-181767号公報や文献（The Journal of Immunology 155, 2477-2486 (1995); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3561-3565 (1995)）に従って取得することが可能である。合成DNAであれば、例えばホスホアミダイト法 [Mattenczi, M.D. & Caruthers, M. H. J., Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)]、またはホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al., Nature 310, 105 (1984)]等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することができる。本発明のDNAは、修飾されたヌクレオチドが含まれていてもよい。また本発明においてDNAには、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAが含まれる。すなわち本発明は、上記CTGATTCACを含む二本鎖DNAおよび該二本鎖DNAのいずれか一方の鎖からなる一本鎖DNAを提供する。二本鎖DNAは、転写因子の結合を検出したり、プロモーターの一部として用いることができる。一本鎖DNAは、例えば三重鎖DNA形成による転写阻害などにおいて有用である。なお二本鎖DNAは、末端またはその他の位置に一本鎖部分を有していてもよい。本発明のDNAは好ましくは二本鎖DNAである。本発明のDNAの

鎖長は、例えば15ヌクレオチド以上、好ましくは20ヌクレオチド以上、より好ましくは25ヌクレオチド以上、さらに好ましくは30ヌクレオチド以上である。また本発明のDNAの鎖長は、例えば3000ヌクレオチド以下、好ましくは1000ヌクレオチド以下、より好ましくは500ヌクレオチド以下、さらに好ましくは200ヌクレオチド以下である。

【0020】本発明のDNAとしては、例えば実施例に記載されているような、ヒトMEGSIN遺伝子の -4021~+130、-2542~+130、-1874~+130、-1451~+130、-1052~+130、-834~+130、-504~+130、または -240~+130の塩基配列を含むDNAなどが挙げられる（数字は転写開始点を+1、その直前の塩基を-1とした位置を表す；実施例参照）。また-179~+130、-169~+130、-159~+130、-149~+130、-139~+130、-129~+130、または -121~+130の塩基配列を含むDNAなどが挙げられる。また、本発明のDNAとしては、MEGSIN遺伝子の転写開始点から下流の転写される配列を含まないDNAがより好適である。このようなDNAは、他の遺伝子または人工的に設計した転写ユニットと組み合わせて下流の遺伝子の転写を制御するために有用である。また、このようなDNAは転写因子結合アクセシに利用することもできる。具体的には、本発明のDNAとしては、好ましくはヒトMEGSIN遺伝子の -101~+86までの塩基配列を含まない、より好ましくは -103~+86までの塩基配列を含まない、より好ましくは -105~+86までの塩基配列を含まない、より好ましくは -107~+86までの塩基配列を含まない、より好ましくは -109~+86までの塩基配列を含まないDNAが挙げられる。

【0021】また、例えば本発明のDNAは、CTGATTCAC（配列番号：2）を含むDNAであって、配列番号：1に記載の塩基配列の1番目から3921番目（-102；転写開始点からの位置）までの塩基配列中の少なくとも15塩基の連続した塩基配列からなる単離されたDNAが含まれる。さらに好ましくは、本発明のDNAは、CTGATTCAC配列を含むDNAであって、配列番号：1に記載の塩基配列中の1番目から3919番目（-104）まで、より好ましくは1番目から3917番目（-106）まで、より好ましくは1番目から3915番目（-108）まで、より好ましくは1番目から3913番目（-110）までの塩基配列の少なくとも15塩基の連続した塩基配列からなる単離されたDNAである。また本発明は、これらの配列番号：1の部分配列からなるDNAのいずれかまたは両方の末端に他のDNAが結合した組み換えDNAを提供する。

【0022】また本発明は、配列番号：1に記載の塩基配列中のCTGATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列において、該CTGATTCAC以外の1または複数の塩基を置換、欠失、および/または挿入した塩基配列を含む単離されたDNAであって、転写を正に制御する活性を有するDNAを提供する。このようなDNAとしては、例えば、上記本発明の、配列番号：1に記載の塩基配列のCT

GATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列を含むDNAにおいて、該CTGATTCAC以外の1または複数の塩基を置換、欠失、および/または挿入した塩基配列からなるDNAであって、転写を正に制御する活性を有するDNAが挙げられる。例えばヒトMEGSIN遺伝子のプロモーター領域の断片を含むDNAは、そのプロモーター領域のCTGATTCAC以外の部分に1または複数の塩基を置換、挿入、および/または欠失することにより配列を改変することができる。このようなDNAであって、転写を正に制御する活性を有するDNAは本発明のDNAに含まれる。例えば本発明者らは、実施例において、ヒトMEGSIN遺伝子のプロモーター中のCTGATTCAC近傍に位置するoct-1結合配列を改変(-111~-110部位)しても、転写活性が維持されることを示した。また、転写開始点に対して-4021~-121までの領域のDNAを欠失させても、転写活性に有意な影響を与えなかった。従って、DNAにこれらの配列が含まれる場合、転写活性を失わせることなく、これらの塩基配列を適宜改変することができる。塩基配列において置換、欠失、および/または挿入する塩基の数は、適宜調節することができるが、例えば、対象とするDNAに含まれる、配列番号：1に記載の塩基配列のCTGATTCACを含む15塩基からなる連続した任意の塩基配列中においては、好ましくは5塩基以下、より好ましくは4塩基以下、さらに好ましくは3塩基以下、さらに好ましくは2塩基、最も好ましくは1塩基とすることが好ましい。

【0023】本発明のDNAは、他のDNAと結合していてもよい。他のDNAとしては任意のDNAが挙げられ、例えば種々のプロモーター配列が含まれる。また、本発明のDNAの下流(CTGATTCACを含む鎖の3'側)の転写領域に、蛋白質をコードするDNAなどの遺伝子を連結することができる。また、本発明のDNAは、CTGATTCACを複数コピー含むDNAが含まれる。例えばCTGATTCACを2コピー、3コピー、またはそれ以上含んでよい。

【0024】本発明のDNAは、このDNAに結合する化合物を検出するために使用することができる。本発明は、本発明のDNAに結合する化合物を検出する方法であって、(a)被検化合物を含む試料を本発明のDNAに接触させる工程、および(b)該DNAと該化合物との結合を検出する工程、を含む方法に関する。また、この検出方法を利用すれば、本発明のDNAに結合する化合物をスクリーニングすることが可能である。すなわち本発明は、本発明のDNAに結合する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被検化合物を含む試料を本発明のDNAに接触させる工程、(b)該DNAと該化合物との結合を検出する工程、および(c)該DNAに結合する化合物を選択する工程、を含む方法に関する。この方法は、特に本発明のDNAに結合する蛋白質を検出またはスクリーニングするために用いられる。本発明のDNAに結合する蛋白質としては、特に転写因子を挙げることができる。「転写因子」とは、DNAに直接または間接的に結合して、該D

NAの下流の遺伝子の発現を正または負に調節する蛋白質を言う。転写因子には、転写に必須の蛋白質および必須ではないが転写レベルを調節する蛋白質などが含まれる。本発明の方法により、上記DNAに結合し転写を制御する新たな転写因子を単離することができる。上記の検出およびスクリーニングは、当業者に公知の方法(岡田博人編、「新細胞工学実験プロトコル」、秀潤社、1993年、田村隆明編、「バイオマニユアルシリーズ5転写因子研究法」、羊土社、1993年、Inouye, C. et al., DNA Cell Biol., 13, 731-742 (1994) 参照)、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリンティング法、EMSA (electrophoretic mobility shift assay) 法、one-hybrid法などにより行うことができる。また、DNA固定化ビーズ等を用いたプルダウンアッセイ、BIACORE等の表面プラズモン共鳴を利用した結合測定、あるいは蛍光偏光法測定によるDNA蛋白質間相互作用解析などにより実施することもできる。

【0025】例えばアフィニティーカラム法を用いる場合は、本発明のDNAをセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、被検試料として核抽出液などをかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化したDNAと同様の配列を有するDNAを用いて結合した蛋白質を溶出することができる。

【0026】EMSA法(ゲルシフト法とも呼ばれる)では、通常数十塩基の2本鎖オリゴヌクレオチドからなる標識DNAとDNA結合性因子(通常細胞の核抽出液)を反応させ、核抽出液中に含まれるDNA結合蛋白質をDNAに結合させる。その後、非変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行うと、蛋白質が結合したDNAの移動度が未結合のDNAの移動度よりも小さくなるので、これを標識したDNAを用いて行い、その移動度を検出する方法である。細胞の核抽出液としては、例えば培養ヒトメサンギウム細胞の核抽出物を用いることができる。

【0027】具体的には、例えばお互いに完全に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、ヒートブロック中95°C 5分で一本鎖とし、その後ヒートブロックの電源を切り、室温に戻るまでそのままにする(一本鎖DNAの2本鎖化)。例えばMEGALABEL(商標)Kit(Takara酒造社)を用いて³²Pラベルを行い、ProbeQuant(商標)G-50 Micro Columns(Pharmacia社)等により精製する(DNAの標識)。反応は、例えば10mM Tris-Cl(pH7.5)、1mM DTT、1mM EDTA、10% Glycerol、1mM MgCl₂、0.15MKCl、Salmon Sperm DNA(denatured)1μg、およびSalmon Sperm DNA(non-denatured)1μgの存在下で、10μgの蛋白質を含む核抽出液を加え、氷中で15分反応させる。必要であればここに非標識コンペティターとしてラベルしていないDNA(例えば10pmol)を入れる。ラベルしたDNAを加え(例えば約80000cpm相当)、さらに室温で20分反応させ、4.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動す

る。ゲルを乾燥させた後、オートラジオグラフィーによりパターンを解析を行う。これにより、プローブに結合する核蛋白質を確認することができる。

【0028】非標識コンペティターとしては、標識プローブと同一の配列または他の転写因子結合配列を含むDNAを用いることができる。転写因子結合配列としては、例えば AP-1、AP-2、SP-1、oct-1およびNF- κ B等の結合モチーフを用いることができる。これらのコンペティターによりバンドシフトが消失すれば、プローブにコンペティターに結合するのと同じ転写因子が結合していたことが示唆される。また、プローブに結合する蛋白質の同定は、例えばスーパーシフトアッセイにより実施することもできる。例えば反応液に既知の転写因子に対する抗体を添加し、スーパーシフトが見られれば、添加した抗体が結合する転写因子がプローブと共に複合体を形成することが分かる。

【0029】本発明の検出方法は、本発明のDNAが関与する遺伝子発現の異常の検査および診断に用いることが可能である。本発明のDNAの変異あるいは転写因子の変異または発現異常は重篤な遺伝疾患を引き起こすと考えられることから、本発明のDNAを用いた上記検出方法により、これらの検査および診断を行うことができる。すなわち、被検試料において本発明のDNAに結合する蛋白質を上記の方法により検出する。検出された本発明のDNAに結合する蛋白質の量または構造あるいは本発明のDNAと該蛋白質との結合に異常があれば、本発明のDNAを介した遺伝子転写に異常があることが示唆される。この検査または診断は、特にMEGSIIN遺伝子の発現調節の異常の検査に有効であり、特にMEGSIIN遺伝子の発現異常を伴う腎疾患の検査に適用される。このような疾患には、例えばメサンギウム細胞増殖性腎疾患が挙げられる。

【0030】また、本発明のDNAに結合する蛋白質をスクリーニングするには、例えばサウスウエスタン法を用いることができる。例えば本発明のDNAに結合する転写因子等が発現していると予想される細胞（例えばメサンギウム細胞など）由来のmRNAからcDNAを調製する。その後、大腸菌の発現ベクター、例えば λ gt11に該cDNAを組み込んだcDNAライブラリーを作製し、 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を合成させ、ニトロセルロース膜に該融合蛋白質を吸着させて、放射性同位元素で標識された本発明のDNAをプローブにし、結合活性をもつ融合蛋白質を合成するファージを検出または選択することができる。

【0031】またフットプリント法を用いれば、本発明のDNAに結合する蛋白質が結合するDNA配列を特定することができる。具体的には、放射性同位元素で標識した本発明のDNAをプローブとし、これを細胞核抽出液などの被検試料と反応後、DNase Iで消化し、電気泳動することによって本発明のDNAに結合した蛋白質の結合配列を同定することができる。

【0032】one-hybrid法を用いる場合は、例えば、本発明のDNAをレポーター遺伝子上流に挿入し、酵母等のゲノム内に組み込むことによりレポーター株を作成する。次に、上記のcDNAとGAL4（酵母のDNA結合性転写活性化因子）の活性化ドメイン（GAL4 AD）のコード領域とを連結させ、これらの融合蛋白質をコードするような活性化ドメイン(AD)ライブラリーを作製し、これを前述のレポーター株に導入する。ADと上記cDNAがコードする蛋白質とのハイブリッド蛋白質が本発明のDNAに結合することにより転写が活性化され、その効果をレポーター遺伝子の発現を通じて検出することができる。この方法においては、本発明のDNAを2コピー、3コピー、またはそれ以上タンデムに並べた配列を用いるか、またはCTGATTTCAC部分が2コピー、3コピー、またはそれ以上含むようなDNAを用いることが好ましい。

【0033】本発明の検出およびスクリーニング方法により、本発明のDNAに結合する転写因子を同定または単離することができる。本発明は、上記本発明の検出方法またはスクリーニング方法により同定または単離し得る転写因子を提供する。また、この検出方法により、本発明のDNAに結合する転写因子の検出および定量が可能である。すなわち、転写因子と本発明のDNAとの複合体を検出および定量することにより、該転写因子の存在および量を決定することができる。またこの検出により、本発明のDNAと転写因子との結合性の異常を評価したり、あるいはゲル電気泳動等を通して該転写因子のサイズを測定することもできる。また本発明は、上記本発明の検出方法またはスクリーニング方法により同定または単離し得るDNA結合蛋白質を含む、本発明のDNAの結合剤を提供する。これらの結合剤は、その本発明のDNAとの結合を調整し得る薬剤のスクリーニング等に有用である。

【0034】また上記の検出およびスクリーニングにおいて、CTGATTTCACを欠損させた対照組み換えDNAを用いて同様の検出を行い、その結果を比較してもよい。すなわち本発明は、本発明のDNAにCTGATTTCAC依存的に結合する化合物の検出方法であって、（a）被検化合物を含む試料を本発明のCTGATTTCACを含むDNAに接触させる工程、

（b）被検化合物を含む試料を、該DNAにおいてCTGATTTCACが欠損または変異しているDNAに接触させる工程、

（c）工程（a）および（b）において、それぞれのDNAと該化合物との結合を検出し、両者の結合を比較する工程、を含む方法に関する。この方法により、本発明のDNAとそれに結合する化合物の結合に及ぼすCTGATTTCACの効果を検出することができる。すなわち工程（b）において検出した結合より、工程（a）で検出した結合の方が有意に強ければ、この化合物は本発明のDNAにCTGATTTCAC依存的に結合していることが分かる。また本発明は、本発明のDNAにCTGATTTCAC依存的に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、（a）被検化合物を含む試料を本発明のCTGATTTCACを含むDNAに接触させる工程、

(b) 被検化合物を含む試料を、該DNAにおいてCTGATTCACが欠損または変異しているDNAに接触させる工程、

(c) 工程(a)および(b)において、それぞれのDNAと該化合物との結合を検出し、両者の結合を比較する工程、(d) 該CTGATTCACが欠損または変異しているDNAに対する結合と比較して、該CTGATTCACを含むDNAに対して有意に強く結合する化合物を選択する工程、を含む方法に関する。CTGATTCACを欠損させたDNAとしては、例えばCTGATTCACを欠失させたり、またはCTGATTCACを他の配列(例えばCaGAATCtC; 小文字は変異させた塩基)に置換したDNAなどが挙げられる。あるいは、複数のCTGATTCACを含む場合には、そのコピー数が少ないDNAを用いることもできる。これらの方法により、CTGATTCACに対して特異的に結合する化合物をより確実に選択することができる。

【0035】本発明の検出方法を利用すれば、本発明のDNAと、このDNAに結合する蛋白質との結合に及ぼす被検化合物の効果を検出したり、あるいはこの結合を調節する化合物をスクリーニングすることができる。本発明は、本発明のDNAとこのDNAに結合する蛋白質との結合に及ぼす被検化合物の効果を評価する方法であって、

(a) 被検化合物を含む試料の存在下、該DNAと該蛋白質とを接触させる工程、(b) 該DNAと該蛋白質との結合を検出する工程、(c) 該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該蛋白質との結合と比較することにより、該結合に及ぼす被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法に関する。被検化合物の非存在下に比べ、存在下における該DNAと該蛋白質との結合レベルが上昇すれば、該被検化合物は該結合を促進する効果があり、該被検化合物存在下における該DNAと該蛋白質との結合レベルが低下すれば、該被検化合物は該結合を抑制する効果があると判断される。また、この検出方法を利用すれば、本発明のDNAと該DNAに結合する蛋白質との結合を調節する化合物をスクリーニングすることが可能である。すなわち本発明は、本発明のDNAとこのDNAに結合する蛋白質との結合を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被検化合物を含む試料の存在下、該DNAと該蛋白質とを接触させる工程、(b) 該DNAと該蛋白質との結合を検出する工程、(c) 該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該蛋白質との結合と比較することにより、該結合に及ぼす被検化合物の効果を評価する工程、(d) 該DNAと該蛋白質との結合を調節する化合物を選択する工程、を含む方法に関する。

【0036】上記の方法で用いられる本発明のDNAに結合する蛋白質は精製蛋白質であってもよく、あるいは未精製または粗精製蛋白質であってもよい。例えば細胞の核抽出物などの形態であってもよい。例えば、HDF (human dermal fibroblast: ヒト皮膚線維芽細胞)、HRE (human renal epithelial cell: ヒト腎上皮細胞)、HMC

(human mesangial cell: ヒトメサンギウム細胞)、HeLa、FL、Chang liverまたはA431細胞などのヒト細胞または哺乳動物細胞の核抽出物またはそこから精製された蛋白質等を好適に用いることができる。細胞からの核抽出物の調製は、例えばDignamらの方法に従って行うことができる(Dignam, J.D. et al., Nucl. Acid Res., 11, 1475-1489 (1983))。また、核抽出物からの蛋白質の分離・精製は、例えば塩析、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどを含む公知の生化学的手法により実施することができる。また、これらの細胞から調製したmRNAを用いて上記のように本発明のDNAに結合する蛋白質の発現スクリーニングを行い、本発明のDNAに結合する蛋白質をコードする遺伝子をクローニングすることができる。得られたクローンを大腸菌、酵母、昆虫細胞、または哺乳動物細胞等で発現させ、組み換え蛋白質を調製することができる。こうして得られた組み換え蛋白質を上記本発明の方法に用いることができる。また、本発明のDNAに結合する既知の転写因子を組み換え蛋白質として調製または入手して用いてもよい。

【0037】本発明のDNAに結合する蛋白質としては、例えば本発明のDNAにCTGATTCAC依存的に結合する所望の蛋白質が用いられる。このような蛋白質としてはAP-1が挙げられる。AP-1 (activator protein 1) とは、脊椎動物の主要な転写因子の1つであり、Junファミリーのメンバーおよび/またはFosファミリーのメンバーを含む蛋白質複合体である。Junファミリーのメンバーとしては、c-Jun、JunB、およびJunDが含まれる。またFosファミリーのメンバーとしては、c-Fos、FosB、Fra1、およびFra2が含まれる。JunファミリーおよびFosファミリーは共に塩基性アミノ酸クラスターおよびロイシンジッパー(bZIP)を含み、ロイシンジッパーを介して形成されるヘテロまたはホモ二量体はDNAに結合して下流にある遺伝子の転写を調節する。本発明の方法において用いられるAP-1は、構成するJunおよびFosファミリーの異なる複数種の複合体の混合物であってもよく、特定のFos/Junヘテロダイマーを用いてもよい。本発明において用いられるAP-1は、好ましくは哺乳動物のAP-1、より好ましくはヒトAP-1である。

【0038】本発明は、本発明のDNAとAP-1との結合に及ぼす化合物の効果を評価する方法であって、(a) 被検化合物を含む試料の存在下、該DNAとAP-1を接触させる工程、および(b) 該DNAと該AP-1との結合を検出する工程、(c) 該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該AP-1との結合と比較することにより、該結合に及ぼす被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法に関する。被検化合物の非存在下に比べ、存在下における該DNAとAP-1との結合レベルが上昇すれば、該被検化合物は該結合を促進する効果があり、該被検化合物存在下における該DNAとAP-1との結合レベルが低下すれば

ば、該被検化合物は該結合を抑制する効果があると判断される。本発明のDNAとAP-1との結合を調節することにより遺伝子の転写を制御することが可能であることから、この検出方法は遺伝子の転写を調節する化合物を検出するためにも有用である。また本発明は、本発明のDNAとAP-1との結合を調節する化合物のスクリーニング方法であって、(a)被検化合物を含む試料の存在下、該DNAとAP-1を接触させる工程、(b)該DNAと該AP-1との結合を検出する工程、(c)該結合を、被検化合物の非存在下における該DNAと該AP-1との結合と比較することにより、該結合に及ぼす被検化合物の効果を評価する工程、(d)該DNAと該AP-1との結合を調節する化合物を選択する工程、を含む方法に関する。このスクリーニング方法も、遺伝子の転写を調節する化合物をスクリーニングするために有用である。AP-1複合体は、細胞内の内因的な発現により形成されているものであってもよく、あるいは、例えばFosファミリーおよびJunファミリーのメンバーをコードする遺伝子を細胞に導入し、この細胞内で外来的に形成させることができる。

【0039】本発明においてスクリーニングまたは検出に用いられる被検化合物に特に制限はなく、例えば無機化合物、有機化合物、天然または合成糖類、ペプチド、ポリヌクレオチド、蛋白質、天然または合成低分子化合物、天然または合成高分子化合物、組織または細胞抽出液、微生物の培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分などが挙げられる。また、遺伝子ライブラリーの発現産物または発現cDNAライブラリーなどを用いることもできる。被検化合物は、本発明のDNAと該DNAに結合する蛋白質とを接触させる前、同時、または後に適用することができ、これらの態様はすべて本発明に含まれる。被検化合物の適用方法に特に制限はなく、インビトロであれば反応液に添加することができる。また、細胞を用いた系でスクリーニングする場合には、細胞の培養液に添加したり、あるいは細胞内にトランスフェクションすることができる。また、蛋白質などを被検化合物とする場合には、該蛋白質をコードする遺伝子を細胞に導入して発現させてもよい。被検化合物は適宜組成物として適用得る。例えば水、生理食塩水、緩衝液、塩、安定剤、保存剤、懸濁剤などと混合されてよい。

【0040】被検化合物の非存在下における場合と比べ、被検化合物の存在下で本発明のDNAとその結合蛋白質との結合が低下すれば、この化合物は該結合を阻害する活性を有する化合物の候補となる。また、被検化合物により該結合が促進されれば、この化合物は該結合を促進する化合物の候補となる。これらの化合物は、本発明のDNAによる転写を調節する薬剤として有用である。

【0041】また、上記の本発明のDNAは、転写を制御するために用いることができる。本発明は、所望の遺伝子の転写制御領域中において本発明のDNAを挿入するまたは取り除く工程を含む、該遺伝子の転写を制御する方

法を提供する。またこの方法には、所望の遺伝子の転写制御領域中において本発明のDNAを挿入するまたは取り除く工程を含む、該遺伝子の転写制御が改変された組み換えDNAの製造方法も含まれる。遺伝子の転写制御領域とは、遺伝子の転写を制御する配列を含むDNA領域を言い、一般に遺伝子の転写開始点の上流に存在する。ここに、本発明のDNAを挿入するまたは取り除くことにより、転写を制御することができる。本発明のDNAは、メサンギウム細胞を含む特定の細胞において転写を誘導できることから、本発明のDNAを挿入したり、あるいは塩基置換等により本発明をDNAを構成するように改変することにより腎臓メサンギウム等の組織特異的に外来遺伝子を発現させることが可能となる。挿入する本発明のDNAのコピー数は、1コピーでもよく、あるいは2コピー以上、例えば3コピーまたはそれ以上挿入してよい。また、対象とする遺伝子の転写制御領域に本発明のDNAが含まれる場合には、これを欠失させたり、あるいは他の配列と置換することにより、転写制御を改変することができる。この場合、該本発明のDNA中のCTGATTCAC 配列を欠損させることが好ましい。

【0042】また本発明は、上記本発明のDNAの下流に機能的に遺伝子が連結された組み換えDNAを提供する。この組み換えDNAは、該本発明のDNAと該遺伝子が、自然の状態で結合しているのとは異なる形態で結合されているDNAである。より特定すれば、それらが人為的に自然の状態で結合しているのとは異なる形態で結合されたDNAを言う。組み換えDNAは、例えばDNA断片同士をライゲーションすることにより作製することができる。例えば制限酵素処理やPCR増幅などで生成したDNA断片をDNAライゲースにより結合させることにより組み換えDNAを製造することができる。「機能的に連結された」とは、下流の遺伝子の発現を制御できるように、本発明のDNAが該遺伝子と連結されていることを言う。下流とは、本発明のDNAのCTGATTCACを含む鎖の3'側を意味する。連結させる遺伝子に特に制限はないが、例えばヒトおよびその他の哺乳動物が持つ所望の遺伝子が挙げられる。本発明のDNAを用いて、例えばMEGSIN以外の所望の遺伝子をMEGSINと類似した転写制御下で発現させることが可能である。該組み換えDNAは、所望のプロモーターおよびエンハンサー配列等を含んでよい。このような組み換えDNAは転写活性を有しており、適当な細胞において、該機能的に連結された遺伝子の転写を誘導する。より好ましくは、本発明の組み換えDNAはCTGATTCACに依存した転写活性を有する。CTGATTCACに依存した転写活性を有するとは、CTGATTCACが、下流に連結された遺伝子の転写活性に寄与することを言い、具体的には、本発明のDNAを含む組み換えDNAにおいて、CTGATTCACの配列またはその一部を欠失または変異させた場合に転写活性が有意に低下することにより、CTGATTCACが転写活性に寄与することを確認することができる。欠失および変異のタイプは特

に限定されないが、具体的には、欠失であれば、CTGATT CACの9塩基またはその一部を欠失させることが挙げられる。また、塩基置換による変異であれば、例えばCTGATT CACの下線部の塩基の1塩基、いずれかの組み合わせの2塩基、または3塩基の全てを他の塩基に置換することが挙げられ、具体的にはCaGAATCTC（小文字は変異させた塩基）に置換することなどが挙げられる（実施例参照）。CTGATTCAC配列を複数コピー含むならば、その中の1つまたは複数（または全部）を欠失または変異させた場合に転写活性が有意に低下する場合、この組み換えDNAはCTGATTCACに依存した転写活性を有すると判断される。転写活性は、例えば組み換えDNAを細胞に導入して測定することができる。例えばヒトメサンギウム細胞（HMC）等の細胞において転写活性を測定する。本発明の転写調節DNAを含み、CTGATTCACに依存した転写活性を示す組み換えDNAは本発明に含まれる。

【0043】このような組み換えDNAとしては、例えば所望のプロモーターと遺伝子を含む発現ベクターの転写開始点上流に、CTGATTCACを含む本発明の短いDNA断片（例えば15～200 bp程度）を挿入したDNAが挙げられる。このようなキメラプロモーターの作製は、当業者が通常行っている。CTGATTCACを含む短いDNA断片は1コピーのみ導入してもよいし、複数コピー（2コピー以上）導入してもよい。例えば2、3、または4コピー以上のCTGATTCACを含む本発明のDNAを挿入して、より強い転写調節効果を得ることも可能かも知れない。転写開始点から直近のCTGATTCAC配列までの間は、例えば30～200bp、好ましくは50～150bp、より好ましくは80～120bpとする。この間にはTATAボックス [Groudine, M. et al., Mol. Cell. Biol., 1, 281-288 (1981)] および/またはCAATボックス [Maniatis, T. et al., Science, 236, 1237-1245 (1987)] が含まれていてよい。好ましくは、上記本発明の組み換えDNAは、CTGATTCAC配列と転写開始点の間にTATAボックスを含み、より好ましくはTATAボックスおよびCAATボックスを含む。

【0044】このような組み換えDNAは、発現ベクターとして極めて有用である。例えばメサンギウム細胞など特定の細胞で所望の遺伝子を発現させるために、該遺伝子の upstream に、上記で示した本発明のDNAを結合させたベクターを構築し、これを標的細胞に導入する。これにより、本発明のDNAに従い遺伝子発現を制御することができる。本発明のDNAは特に、腎臓（メサンギウム細胞）で高率に遺伝子を発現させる活性を有する。従って本発明のDNAは、腎臓（特にメサンギウム細胞）を標的とした発現ベクターの開発に利用できる。このような腎臓特異的に転写が活性化する組み換えDNAは、例えば、腎臓疾患の遺伝子治療のためのベクター作製に用いることができる。また、本発明のDNAを介した転写を誘導する転写因子を発現する他の細胞（臓器）においても同様の効果が期待できる。組み換えベクターの構築や該ベクター

の細胞への導入などの一般的な遺伝子操作は、例えば、文献 (J. Sambrook and D. W. Russell eds., "Molecular cloning: a laboratory manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001) に記載の常法に従って行うことができる。

【0045】本発明の組み換えDNAは、適当なベクターに組み込まれていてもよい。遺伝子治療を目的とする場合、用いられるベクターとしては、例えば、レトロウイルス、単純性ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、ウシバビローマウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、シンドビスウイルス、ボックスウイルスなどに由来するベクターが挙げられる。また、温度感受性リボソーム、血中安定性リボソーム、カチオニックリボソーム、pH感受性リボソームおよびウイルスのエンベロープ蛋白質を組み込んだ再構成リボソームなどのリボソーム製剤、HVJ（センダイウイルス）-リボソーム [T. Nakagawa et al., Drug Delivery System, 11, 411 (1996)]、VSV（水疱性口内炎ウイルス）-リボソーム（特開平11-187873号）などのウイルスの膜融合能を付与した膜融合リボソーム製剤などを用いることもできる。これらのベクターを導入する対象となる細胞としては、例えば、メサンギウム細胞、尿細管細胞、マクロファージ、リンパ球、内皮細胞、腫瘍細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】また、上記の組み換えDNAを用いて、本発明のDNAの転写活性に及ぼす被検化合物の効果を評価することが可能である。この方法は、(a) 被検化合物を含む試料の存在下、上記本発明の組み換えDNAを発現させる工程、および (b) 該発現を検出する工程、(c) 該発現を、被検化合物の非存在下における上記本発明の組み換えDNAの発現と比較することにより、該転写活性に及ぼす被検化合物の効果を評価する工程、を含む方法である。またこの方法を用いて本発明のDNAの転写活性を調節する化合物をスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物を含む試料の存在下、上記本発明の組み換えDNAを発現させる工程、(b) 該発現を検出する工程、(c) 該発現を、被検化合物の非存在下における上記本発明の組み換えDNAの発現と比較することにより、該転写活性に及ぼす被検化合物の効果を評価する工程、および (d) 該発現を調節する化合物を選択する工程、を含む方法である。

【0047】具体的には、本発明のDNAを挿入した発現ベクターを細胞に導入し、本発明のDNAの下流に連結した遺伝子を発現させる。被検化合物の存在下で発現ベクターからの該遺伝子の発現を検出する。用いられる細胞としては、例えば、HDF、HRE、HMC、HeLa、FL、Chang 1 liver または A431 細胞などが挙げられる。その他にも、尿細管細胞、マクロファージ、リンパ球、内皮細胞、腫瘍細胞などの細胞を用いてもよい。好ましくはメサンギウム細胞が用いられる。スクリーニングに用いられる被検

化合物は、上記と同様に特に制限はなく、例えば無機化合物、有機化合物、天然または合成糖類、ペプチド、ポリヌクレオチド、蛋白質、天然または合成低分子化合物、天然または合成高分子化合物、組織または細胞抽出液、微生物の培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分などが挙げられる。また、遺伝子ライブラリーの発現産物または発現cDNAライブラリーなどを用いることもできる。被検化合物を適用するタイミングに制限はない。例えば細胞系を用いる場合は、被検化合物を含む試料を培養液等に添加することができる。また、細胞に遺伝子を導入し、その発現産物を被検化合物としてもよい。被検化合物により発現レベルが上昇すれば、この化合物は本発明のDNAの転写活性を上昇させる化合物の候補になる。また被検化合物により発現レベルが低下すれば、この化合物は本発明のDNAの転写活性を低下させる化合物の候補になる。

【0048】一般的には、例えば発光反応や呈色反応などにより定量が容易に行える蛋白質をコードする遺伝子（レポーター遺伝子）を、本発明のDNAの下流に結合し、これを宿主細胞に導入して呈色反応や発光を検出することにより、プロモーター活性の有無やプロモーター活性の強弱を判定することができる。被検化合物を含む試料の存在下でプロモーター活性を検出し、被検化合物によりプロモーター活性が影響を受けるか、あるいはその程度を測定する。該被検化合物の非存在下における場合に比べ、プロモーター活性を低下させる化合物は、本発明のDNAの転写活性を阻害する薬剤として、また、プロモーター活性を上昇させる化合物は、本発明のDNAの転写活性を促進する薬剤として有用である。また、上記の検出やスクリーニングにより、本発明のDNAを介して転写を活性化する転写因子を同定または単離することもできる。

【0049】また上記の検出やスクリーニングにおいて、CTGATTCACを欠損させた対照組み換えDNAを用いて同様の検出を行い、その結果を比較してもよい。すなわち本発明は、本発明のDNAの転写活性に及ぼす被検化合物の効果を検出する方法であって、（a）被検化合物を含む試料の存在下、上記CTGATTCACを含む組み換えDNAを発現させる工程、（b）被検化合物を含む試料の存在下、該DNAにおいてCTGATTCACが欠損または変異している組み換えDNAを発現させる工程、（c）工程（a）および（b）のそれぞれにおいて、それぞれのDNAの発現を検出し、該発現を、それぞれにおける被検化合物の非存在下における該それぞれのDNAの発現と比較することにより、該それぞれのDNAの転写活性における被検化合物の効果を評価する工程、（d）該被検化合物のCTGATTCAC特異的な効果を検出する工程、を含む方法に関する。また本発明は、本発明のDNAの転写活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、（a）被検化合物を含む試料の存在下、CTGATTCACを含む上記組み換えDNA

を発現させる工程、（b）被検化合物を含む試料の存在下、該DNAにおいてCTGATTCACが欠損または変異している組み換えDNAを発現させる工程、（c）工程（a）および（b）のそれぞれにおいて、それぞれのDNAの発現を検出し、該発現を、それぞれにおける被検化合物の非存在下における該それぞれのDNAの発現と比較することにより、該それぞれのDNAの転写活性における被検化合物の効果を評価する工程、（d）該被検化合物のCTGATTCAC特異的な効果を検出する工程、（e）CTGATTCAC特異的に転写を調節する化合物を選択する工程、を含む方法に関する。すなわち、工程（e）において、CTGATTCACが欠損または変異しているDNAの発現に与える効果と比較して、CTGATTCACを含むDNAの発現に対して有意に強い程度で該発現を調節する化合物を選択することにより、CTGATTCAC特異的に転写を調節する化合物を得ることができる。工程（c）では、例えば被検化合物の存在下における発現レベルの非存在下における発現レベルに対する比（変化倍数）を、CTGATTCACを含むDNAと含まないDNAにおいて求めることができる。工程（e）において、CTGATTCACを含むDNAにおける変化倍数が、CTGATTCACを含まないDNAにおける変化倍数よりも有意に高いような化合物を選択する。このように選択された化合物で、CTGATTCACを含むDNAの発現を低下させる化合物は、本発明のDNAの発現を低下させる化合物、逆に上昇させる化合物は、本発明のDNAの発現を上昇させる化合物と判定される。CTGATTCACを欠損させたDNAとしては、例えばCTGATTCACを欠失させたDNA、あるいは他の配列（例えばCaGAATCTC；小文字は変異させた塩基）に置換したDNAなどが挙げられる。あるいは、複数のCTGATTCACを含む場合には、そのコピー数が少ないDNAを用いることもできる。あるいは、別のプロモーターを用いてもよい。これらの方法により、CTGATTCACに対して特異的に作用する化合物をより確実に選択することができる。

【0050】本発明のスクリーニング方法により選択され得る化合物は、転写調節剤（転写促進剤または転写抑制剤）として有用である。また、本発明は、本発明のDNA、あるいは、より好ましくは配列番号：1に記載の塩基配列のCTGATTCACを含む少なくとも15塩基の連続した塩基配列を含む単離DNAを含む、転写抑制剤を提供する。例えば、これらのDNAは、細胞に投与することによりデコイ核酸として転写因子の作用を阻害し、転写を抑制することができる。また、プロモーター領域で三重鎖構造を形成させれば、転写因子のプロモーターへの結合を阻害することができる。本発明の転写調節剤は特に、MEGSI遺伝子の転写調節剤として有用である。本発明は、本発明のDNAおよび本発明のスクリーニングにより選択され得る化合物の転写調節剤としての使用、および転写調節剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明のDNAおよび本発明のスクリーニングにより選択され得る化合物を投与する工程を含む、転写を調節

する方法に関する。本発明の転写調節剤は、メサングウム細胞の増殖を調節する薬剤となる。すなわちMEGSIN遺伝子の転写を促進する薬剤は、メサングウム細胞の増殖の促進剤となり、MEGSIN遺伝子の転写を抑制する薬剤は、メサングウム細胞の増殖の抑制剤となる。MEGSIN遺伝子は、腎メサングウム細胞で発現し、その発現の亢進はメサングウム細胞を主体とする著明な細胞増殖、メサングウム基質の増生、並びに免疫グロブリンや補体から成る免疫複合体の沈着亢進が認められ、典型的なメサングウム増殖性糸球体腎炎の症状を引き起こす(W001/24628)。また、MEGSIN発現量がIgA腎症患者や糖尿病性腎症患者において亢進していることも、MEGSINの発現の亢進が腎疾患の発症に関与していることを支持する。このように、MEGSIN遺伝子の転写を抑制する薬剤は、特にメサングウム細胞増殖性腎疾患に対する医薬として有用である。本発明におけるメサングウム細胞増殖性腎疾患とは、腎メサングウム細胞の増殖とメサングウム基質の増生を伴う腎疾患を意味する。このような腎疾患には、たとえばIgA腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、SLE(systemic lupus erythematosus)腎症、糖尿病性腎症、あるいはクリオグロブリン腎症等が含まれる。例えば本発明の転写抑制剤を投与することにより、これらのメサングウム細胞増殖性腎疾患の発症や進展を抑制することも可能であると考えられる。すなわち本発明は、本発明のMEGSIN遺伝子の転写を抑制する本発明の転写調節剤を有効成分とする、メサングウム細胞増殖性腎疾患の予防薬および治療薬に関する。また本発明は、メサングウム細胞増殖性腎疾患の予防薬または治療薬の製造のための本発明の転写調節剤の使用に関する。

【0051】また一方、ヒトMEGSINはSERPINスーパーファミリーに属する蛋白質であることから、ヒトMEGSINの異常は、血液凝固能の亢進による血栓塞栓症または線溶能の亢進による出血症をきたすおそれもある(鈴木ら、蛋白質・核酸・酵素、34巻、949-962(1989))。このことは、本発明のDNAの転写活性に影響を与える薬剤がこれら疾患の発症や抑制に作用する可能性があることを示唆する。従って、本発明のスクリーニングは、これら疾患に関連する薬剤を得るためにも有用であり、選択される薬剤は血栓塞栓症および出血症に対する医薬としての利用も期待される。

【0052】本発明のスクリーニング方法によって選択された候補化合物は、更に安全性や安定性などを試験したうえで、例えばメサングウム細胞増殖性腎疾患のための治療用、および／または予防用医薬組成物の主成分とすることができる。本発明の医薬組成物は、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。また主成分である化合物自体を直接投与することもできる。製剤化する場合は、例えば、薬剤として一般的に用いられる媒体または担体と適宜組み合わせ投与することができる。

【0053】また、該化合物がDNAによりコードされるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、鼻腔内投与、気管支内投与、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、経口投与、直腸内投与、患部への直接投与などの方法で行うことができる。投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの条件によって変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。

【0054】すなわち、たとえばメサングウム増殖性糸球体腎炎モデル動物(W001/48019)において、腎炎症状の緩和効果を、様々な投与量の間で比較することにより有効濃度が決定される。そして、上記のような各投与ルートによって、メサングウム細胞における投与化合物の濃度がその有効濃度に達するような投与量を経験的に決定する。一般的な投与形態においては、有効成分が全身に分布するものとして、体重1kg当たりの投与量を決定する。実験動物における薬物動態の解析結果に基づいて腎移行性が高いと考えられる化合物であれば、投与量をより低く設定することができる。

【0055】本発明の医薬組成物は、決定された投与量と投与形態とを考慮して、媒体や担体と配合される。必要な投与量を達成することができるように有効成分を配合することは、当業者が通常行っている。本発明による医薬組成物の投与量は、その有効成分が、体重1kgあたり通常1 μ g～50mg、より一般的には10 μ g～10mg(例えば10 μ g～1mg)とすることができる。また、注射剤の場合は経口投与の100分の1程度を投与量の目安とすることができる。さらに特殊な製剤設計を施すことにより、投与量を調整することができる。例えば、本発明の医薬組成物は、適当な担体に保持することによって徐放化製剤とすることもできるが、このような製剤においては、高い血中濃度を維持することができるので、配合量を低く設定することができる。

【0056】経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤およびシロップ剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、バツカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。

【0057】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。なお、本明細書に引用された文献は全て本明

細書の一部として組み込まれる。

【0058】【実施例1】 ヒトMEGSIN遺伝子の転写制御領域の単離および転写開始点の同定

BACクローンよりヒトMEGSIN遺伝子上流領域約4.0kbpまでのゲノムDNA断片を新たに単離し、転写活性に関わるDNA配列を特定するためこのゲノムDNA配列を決定した

(配列番号: 1)。また、ヒトMEGSIN遺伝子の正確な転写開始点を決定するため、プライマーエクステンション法によるMEGSIN mRNAの5'末端の同定を行った。10%ウシ胎児血清 (GIBCO社)、100 IU/mLのペニシリン、100 μ g/mLのストレプトマイシンおよび200 μ g/mLのL-グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養したヒトメサングウム細胞 (BioWhittaker社) からtotal RNAを抽出した。T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い、標識DNAプローブを作成した。即ち、転写開始点の前後を充分にカバーすると推定される、オリゴヌクレオチドプライマー (5'-AGGCTGTCCA AAGGTGCAGC-3' / 配列番号: 3) (+67~+86に対応することが判明した) をDNA 5'末端標識キット (MEGALABEL (商標): 宝酒造) を用いて、[γ - 32 P]ATPにより5'末端ラベルした後、反応生成物をゲル透過クロマトグラフィー (Sephadex (商標) G-50: Pharmacia社) により精製し、アイソトープ標識プライマーとして使用した。

【0059】次に、1 \times TE、0.25M KCl の存在下で標識プライマーと培養ヒトメサングウム細胞から調製した10 μ gのtotal RNAを60°Cで1時間インキュベートした後、室温で1時間半放置し、アニーリングさせた。DNA-RNAハイブリッドに5 \times first strand buffer 16 μ L、0.1M DTT 8 μ L、2.5M dNTP 8 μ L、d-H₂O 28 μ Lおよび逆転写酵素 (SUPERScript II (商標): GIBCO BRL社) 1 μ Lを加え、37°Cで1時間インキュベートし伸長させた後反応生成物をエタノール沈殿し、dyeにて溶解して100°Cで5分インキュベートした後、氷上で5分放置し変性させ、あらかじめ作成しておいた8%アクリルアミドゲルに添加し電気泳動を行い、ゲルを乾燥させてオートラジオグラフィーにより分析した。また同時にMEGSINプロモーターを含むゲノムDNAを同じプライマーによりシーケンシング反応 (Δ Tth DNA Polymerase SequencingPRO: 東洋紡) を行って泳動を行い比較する事により、MEGSIN mRNAの転写開始点を決定した (図1)。

【0060】その結果、ヒトMEGSIN遺伝子の第1エクソンは373bpであることが判明した。すなわち、転写開始点は配列番号: 1の4023番目のTであった。また、TATAボックス [Groudine, M. et al., Mol. Cell. Biol., 1, 281-288 (1981)] が、転写開始点上流約35bpの部位に存在していた。

【0061】【実施例2】 MEGSIN転写制御領域の機能検定

転写制御領域の検定のため、MEGSIN遺伝子上流領域 (BamH I-Xba I断片; -4021bp~+130bp) またはその欠

失変異DNAとルシフェラーゼ遺伝子を結合させたベクターを作製した。さまざまな欠失変異DNAは、DNA内に存在する制限酵素サイトの組換えにより、或いはアッセイに用いる領域を覆うようなプライマー対を設計し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により調製した。具体的には上流領域-2542のStu Iサイト、-1874のSac Iサイト、-1451のPmaC Iサイト、-1052のKpn Iサイトなどで切断し、必要であれば blunt end にして下記のルシフェラーゼ発現ベクター中にライゲーションにより挿入して作製した。また、-1052bp以下のコンストラクトについてはこれらのコンストラクトを鋳型にPCR法で作製したが、用いたプライマーは以下の通りである。

-834: 5'-TAGGTACCAGGTGTAGGCAACCACTGG-3' (配列番号: 4)

-504: 5'-TAGGTACCGCAGTACAAAGAGAAGCCAG-3' (配列番号: 5)

-240: 5'-TAGGTACCCAGAAGAGTATGTTTTGACC-3' (配列番号: 6)

-72: 5'-TAGGTACCGATACTATTTTGAAACCTGG-3' (配列番号: 7)

尚、アンチセンスプライマーはすべて以下のプライマーを用いた。

Antisense: 5'-TAGATCGCAGATCTCGAGCCCCTAGAC-3' (配列番号: 8)

【0062】これらのPCR産物はKpn IおよびBgl II (またはXho I) で切断し、ルシフェラーゼ発現ベクター (pGL3-Basic Vector: Promega社) の同サイトに組み込んだ。以上の方法により作成した欠失変異DNAは、それぞれMEGSIN遺伝子の -4021~+130、-2542~+130、-1874~+130、-1451~+130、-1052~+130、-834~+130、-504~+130、-240~+130、-72~+130である。これらのコンストラクトは、トランスフェクション試薬 (LipofectAMINE PLUS (商標): GIBCO BRL社) を用いて添付の説明書に従い細胞へ導入した。

【0063】まず、各種欠失変異DNAを組み込んだベクターをヒト類表皮癌細胞株A431細胞へ導入し、本プロモーター領域の中でどの配列が正または負の制御を行うのかを検討した (図2A)。ベクターを37°Cで3時間または6時間の条件でトランスフェクションし、37°Cで1日または2日間培養した後、培養液を取り除き細胞をPBSで1回洗浄し細胞溶解 (Cell lysis) バッファーで溶解させライセートを得た。蛍光の発光量は、ルミノメーター (Lumat LB9507 tube luminometer (商標): Berthold Technologies社) を用いて直接測定した。コトランスフェクションしたpRL-CMVによる出力力の測定値により除することにより相対ルシフェラーゼ活性を求めた。

【0064】さらに、実施例1に記載の培養ヒトメサングウム細胞 (BioWhittaker社) を使用して同様の検討を行った (図2B)。その結果、培養ヒトメサングウム細胞が示す転写活性のパターンとA431細胞が示す転写活性

のパターンが同様であることが確認できた(図2AおよびB)。また、-4021~+130より-240~+130の間のコンストラクトでは転写活性に大きな変動はなく、-240~+130と-72~+130の間において転写活性が激減していることが判明した。これらのことから、培養ヒトメサンギウム細胞と同様にMEGSINを発現することが知られているA431細胞においてもMEGSINプロモーターに対して培養ヒトメサンギウムと同じ転写制御が行われていることが判明した。また、本プロモーター配列において-240~-72の間に非常に強力に正の制御を示す転写制御領域が存在することが判明した。

【0065】次に -4021~+130のコンストラクトを用い、HUVEC(正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)、HDF(正常ヒト皮膚繊維芽細胞)、およびHMC(正常ヒトメサンギウム細胞)、並びにFL(ヒト羊膜由来細胞株)、HeLa(ヒト子宮内膜由来細胞株)、A431、およびChang Liver(ヒト肝癌由来細胞株)にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ヒト正常細胞においてはHMCにおいて強い転写活性が見られた(図3A)。また、ヒト由来細胞株においてもA431に比較的高い転写活性が見られ(図3B)、用いた転写制御領域は細胞特異性を有することが判明した。

【0066】-179~+130から-72~+130の間で10 bp刻みに短いコンストラクトを作製し、A431細胞を用いて転写活性を検討した結果、-121~+130と-99~+130の間で転写活性の激減が見られた(図4)。-121~-99の間のモチーフを検索したところ、AP-1、oct-1、TCF-11 等に高

スコアの配列が見つかった(図5)。当該配列を含む塩基配列約55 bpを欠失させたコンストラクトを作製すると共に、AP-1、oct-1、またはTCF-11 それぞれの変異を含んだコンストラクトを作製し(図6)、上記と同様にA431細胞を用いて転写活性を検討した結果、55 bpを欠失させたコンストラクト(-85~-139欠失構築物)では転写活性が完全に低下した(図7)。また、oct-1ミュータントでは転写活性に変動が見られないのに対し、AP-1ミュータントでは約50%の転写活性の低下が見られた(図7)。さらに、AP-1結合モチーフの部分のみを欠失させたコンストラクトについてA431細胞を用いて同様の検討を行うと、ミュータントと同様に約50%の転写活性の低下が見られた(図8)。

【0067】

【発明の効果】本発明により、メサンギウム細胞に特異的に発現しているMEGSIN遺伝子のプロモーター由来の転写調節DNAが提供された。本発明のDNAは、メサンギウム細胞特異的な遺伝子発現のためのプロモーターの要素として利用することができ、例えば、種々の腎疾患の遺伝子治療への応用が考えられる。また、本発明のDNAを用いて、該DNAに結合する転写因子などの蛋白質のスクリーニングを行うことも可能である。さらに、該DNAは、MEGSIN遺伝子の発現を制御する薬剤のスクリーニングにも利用することができる。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<;110>; KUROKAWA, Kiyoshi
MIYATA, Toshio
<;120>; Transcription regulatory elements and their use
<;130>; KRK-A0104
<;140>;
<;141>;
<;160>; 13
<;170>; PatentIn Ver. 2.0
<;210>; 1
<;211>; 4230
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 1
ggatcctggt ggctccagtt ttttattctc aggttttact tttattttat atcttattta 60
taatgattga tagaattgta aatgaaatga ccacaataag ataaactttt aatagtttcc 120
taatcttatt agacttccca ttagcttata cttatttcat gtgttcttat atgtttcaca 180
tacacagaac atattgtttt tttcttaaag acagaattga tacatgetat tgcaacctct 240
gcccgtaaat taaaggcatc cttctaagggt ttcgcacggg ttggaaattt attactccaa 300
aaatagtcag gaaactactc tgagttgaaa gggtttactt ttgtttttga taaggttata 360
tatgggatcc tctgtttctc atagaccctt atgagaacag atggactgtg atttttttaa 420
gcagattttg tggggatatt tatgaataag tcaagatagt agccatattg tcttctgact 480
tctaaggata agtttaaaag gatgtagtgg gagacaagcc cagaaatgat caggaaagct 540
```


tcatgttca aaaaggaaaa aaaaaatcat aggcacccta ggatctatct cagctgcttc 600
 ttttttttt taacttttat ttttaagtca ggaatacatg tgcaggtttg ttatacaggt 660
 aaactgcatg tcggcaggga cgttgtatag agattatttc ctctcttagg taataagcgt 720
 acacttgagg ctggaggcgg ggagaaggga gaggatcaac tgcttcttat ttgagaaaga 780
 cacaacacaa actttctgag tctactttt ctcatttgta aaatgggaga ctccaactta 840
 aataatgtct aaagtctct ttagcttact atctatctat ctattaataa aggaaaaaat 900
 tggatatata ttactttca aggcactga atttgcatat ttaattaaaa ttaaagttag 960
 gatttaagca tcactctgca aatggaagaa tataggtaga ggttttaaag ctcccattta 1020
 caaacccaac aataatttta aaggataaga aaatagagge ttgtaggaaa attagatata 1080
 tcattttatat ttaactttgc cactgaaact ggtcaaggta aagcttaata aatttaaagg 1140
 tttagaatat ttacttttct atgacaaata atgacattca aaacgtgatg ataaaaaat 1200
 ttaggaggtg aaatgggacc aattactgca ttctcttggt aagttgaaat cctgaggtag 1260
 aaagtgaact ttaatttgc tctaaaatta gatttgatt ttgtttagaa aacctccctg 1320
 tgtttgttca tgaatctcat agaactaaaa ggtttaacta gaaaaggtag cactgataac 1380
 aatagtgatt cttaagaat tttccattta ttattatgtt ggttggggcc acgacaacgt 1440
 gatgaaatga ttagcacaa ataagtggaa accaacaagg cctcctgcag ttggaattct 1500
 gatcagagag atgataggaa gtcccgctga ttgcattcat ttaaatgcat aaggacaata 1560
 ttatatcatg ttatttattg ccaagtgaag gctgcgatta ttcatgtcaa aagtaaaaga 1620
 gaatcagaag aaggaggagg aattatagca aaaagagaag agagggtaaa tatttacatg 1680
 taaacaagag acatagagta actgaattcc tttgtgtcct gccacagta aaacgacaaa 1740
 gaatacatca agaagtaaaa atagacctaa catgcaatca cttagaatga attcacatga 1800
 tagaatctgc aattaagcca tggaacttgc cactacaaga ttttcttcaa atagatagat 1860
 tagaaagggt agatttggt aacagagttt atataaaaat ttcaatgtct ggaatttga 1920
 ccaacaaaa ccatatcaag caaacaaata aaacacaaat gacatcagct tccagggaat 1980
 aggtttatat cttttaggat gtgcaagaa tatccctaatt ttggaacatt aagtattccc 2040
 aggtcatttc cattttctgg gcactacact aaatctagca ccccttacca tgcctcgc 2100
 attagtatte ggtcaccaaa gaattcttat atcttcagcc taactacaga gctctatgta 2160
 accagagttc acagecttct ctactgacac ctctgtaat cctgaattaa tccctagtag 2220
 tttctttaa tccctcttca gccctgggta agtgaggaca agagacagta aaatgtaggt 2280
 tattacagtt catgttctct catctatatg catgaactgg caaggccaat ggaaatttgg 2340
 attatcattg tatggcaagg gagaataatt aatgtaacac gccagtcac atgactgctt 2400
 tcttctcata ctatgtcac tttgggattg gttaattgta aatcaactgt tgcaaacaca 2460
 gtatgggag gtagtctga gttaattgta agaagaaaac aatggtgagt agagccttaa 2520
 ttatggatga ctcttgtaa ttccaagaag attatccagt atgtgtgta cgtgggtccc 2580
 ttgccttita cctattgacc atttcaacc ttgaaagtac ttatatcct cagtaggtaa 2640
 gaaatagaaa ggatatggga ttcaaaatat tcagcctatg aacactgcaa ttgaatatg 2700
 gagaacaggg aatccatttg tagctcatt ttttttttat attacaaca accttctcct 2760
 tcagaaagtt caccacaact gctaaatcaa aattaaattt cagggatttt ctgcaacttt 2820
 acttttctct atgattatc tactcataaa caatcatgga ggtgagcaat aactacttta 2880
 ttcattttg gataagttaa caggaccccc ttcttcttg gaaaggagca aaattgcaca 2940
 aaattgagag gcgagcaact gtaagatgat ggtaccttct aattccaata gctttttaca 3000
 atagagaacc cagttacttg gataaatgtt ggctgtactt ttgaaaacac tcaggcagaa 3060
 ggaccaggt tgcagtcatt tccatgata gcaggtgaag gtaggtgcaa catcacgctc 3120
 aacctcatga tgcacggcc agaaactgaa atgtgttttt gccctgtgt ggcatgttct 3180
 gatggcaag gttaggcaa ccaactgggc ccaacctacc tttccctaca cctggctact 3240
 ttcaaaagt caaacccact ttaacaaact ctacctgta ttataggagg aaggatctgg 3300
 gtggtcaga cgtgcttct cattgccaga tcagaagggt ggaggagagg ctggcaggat 3360
 gacaagaatg aatgaacaca ccaagtttca gctctatct gaagctgctc agttcaggta 3420
 agcatttaga gaagccagtt gcaataacta acagggcaaa tgtttctctg gaaaattcca 3480
 agccagagaa aattgagaaa aagagggaag gatgaaagc agtacaaga gaagccagct 3540

caaaaggtta gaggtccaga tgaaaatctg agattggaga atgataaaaa acattgtgtg 3600
 agattctatt ttaggtcatt atgctaggga aatttacaca ggatagggtt gaaagaaatt 3660
 aggctataag atgagtggca agttgcaata aaatggcacc ctaaactcac caagtcactg 3720
 ttgtcactgc tatcttgccct tagttgattt gatgtctagt tagtctattht gtgtgtttct 3780
 cacagaagag tatgttttga cccaggetga cagatactgt tgattctgaa atttgttttt 3840
 atggttatgt taaaaccatt gtcattataa gaaacagaga tgggaatatt gcctcctgaa 3900
 atctgattca cataaaaact gaatgaacta cataacaacc accttagtca gatactattht 3960
 tgaaacctgg ttcaaaacct aaatgcttat aagattcttg agagacagtg ctgtgctctg 4020
 agtcataggg aagccatccc agaagccagg tctactcate aataagcagc tgctctgtca 4080
 gagtgcaggc tgcacctttg gacagccttht aaaactgaat tctcagaatt ttagaacaah 4140
 tttttgtcta gaaatgctga ctttggttca ttaggtagtg gtaaacagc ctcctctcga 4200
 agctctcctt catcaccttc ctaagtgcatt 4230

<;210>; 2

<;211>; 9

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 2

ctgattcac

9

<;210>; 3

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<;400>; 3

aggctgtcca aaggtgcagc

20

<;210>; 4

<;211>; 28

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<;400>; 4

taggtaccag gtgtaggcaa ccaactgg

28

<;210>; 5

<;211>; 28

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<;400>; 5

taggtaccgc agtacaaaga gaagccag

28

<;210>; 6

<;211>; 28

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <;400>; 6
 taggtaccca gaagagtatg ttttgacc 28
 <;210>; 7
 <;211>; 28
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <;400>; 7
 taggtaccga tactattttg aaacctgg 28
 <;210>; 8
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <;400>; 8
 tagatgcag atctcgagcc cctagac 27
 <;210>; 9
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <;400>; 9
 tcagaatctc atacaaactg aatgaac 27
 <;210>; 10
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <;400>; 10
 tctgattcac gcacaaactg aatgaac 27
 <;210>; 11
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <;400>; 11
 tctgattcac atacaaactg aagacac 27

<;210>; 12
<;211>; 27
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;400>; 12
tctgattcac atacaaactg aatgaac
<;210>; 13
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence
<;400>; 13
tatacaaaact gaatgaac

27

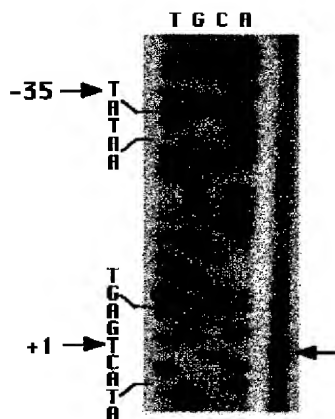
18

【図面の簡単な説明】

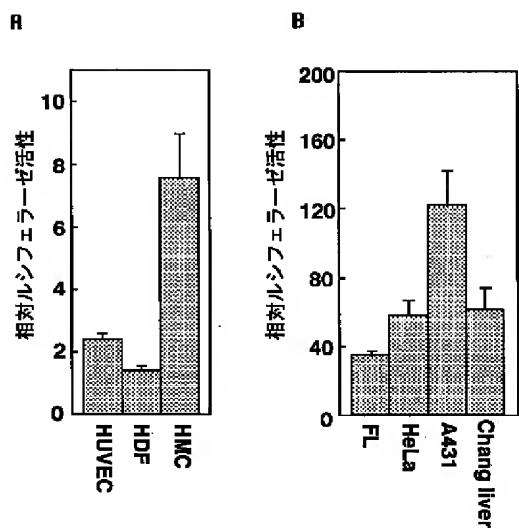
【図 1】プライマーエクステンション法によるMEGSIN転写開始点の同定結果を示す図である。
【図 2】A431細胞 (A) およびヒトメサンギウム細胞 (HMC) (B) におけるMEGSINプロモーター領域の欠失変異体の転写活性パターンを示す図である。-240から-72の領域に、転写を正に制御する配列が存在する。
【図 3】各種正常ヒト (初代培養) 細胞 (A) およびヒト由来細胞株 (B) における -4021~-130 のコンストラクトに含まれる転写制御領域の細胞特異性を示す図である。
【図 4】MEGSINプロモーター領域の欠失変異体の転写活性を示す図である。-121から-99の領域に、転写を正に

制御する配列が存在する。
【図 5】MEGSINプロモーターの-121から-99の領域に見出された転写因子結合配列を示す図である。図中の配列は、配列番号：1 の3893~3939に相当する。
【図 6】MEGSINプロモーターの転写制御領域の構造を示す図である。図中の配列は、配列番号：1 の3761~4230に相当する。-85~-139欠失構築物の欠失領域を図示した。また、AP-1、oct-1、およびTCF-11の結合配列を変異させたときの変異配列を下に示した。
【図 7】各種変異体の転写活性を示す図である。
【図 8】AP-1結合配列の欠失変異体の転写活性を示す図である。

【図 1】

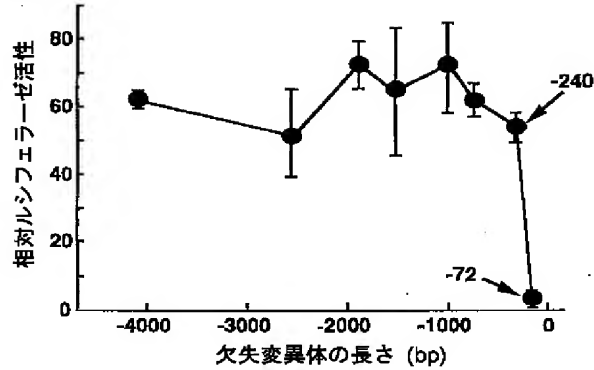


【図 3】

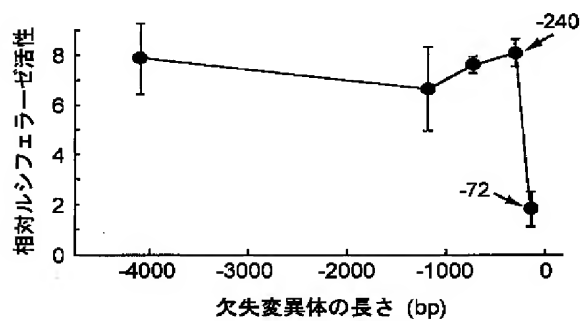


【図2】

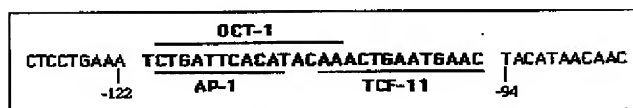
A: A431



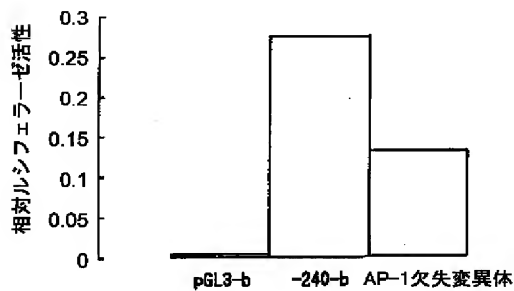
B: HMC



【図5】

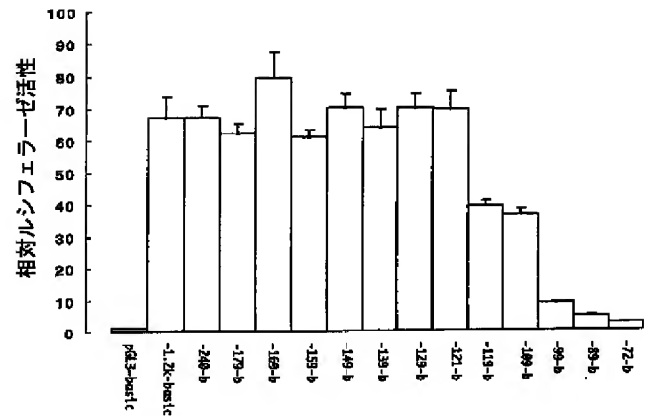


【図8】

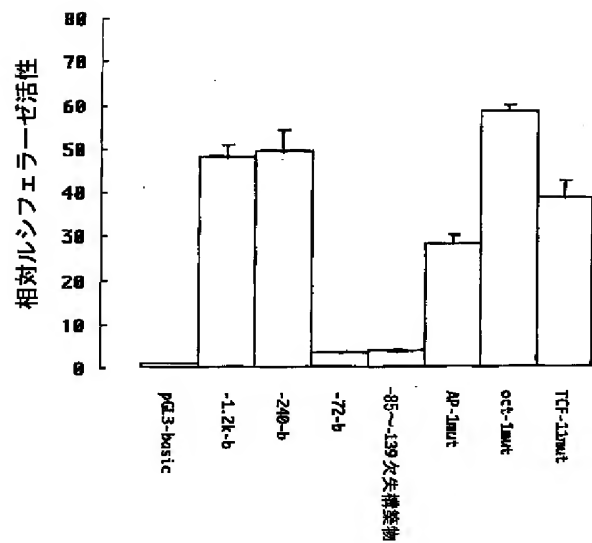


野生型 TCTGATTCACATACAACTGAATGAAC (配列番号:12)
AP-1欠失変異体 T——ATACAACTGAATGAAC (配列番号:13)

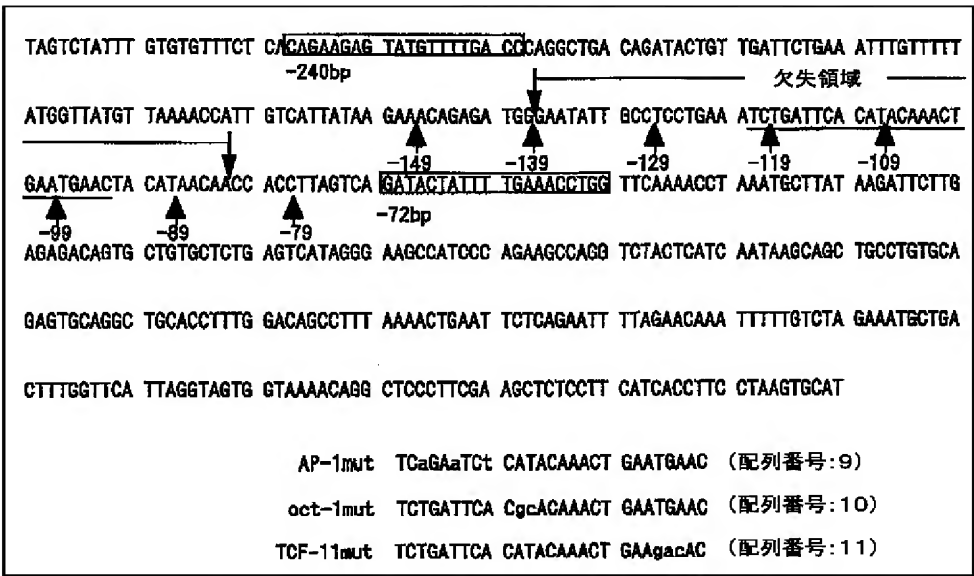
【図4】



【図7】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	サーチコード (参考)
C 1 2 Q	1/68	G O 1 N	33/15 Z
G O 1 N	33/15		33/50 Z
	33/50	C 1 2 N	15/00 Z N A A

(72)発明者	宮田 敏男	F ターム (参考)	2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01
	神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 16-25 エク		CB21 DA12 DA13 DA36 DA77
	セル伊勢原102号		FB02 FB04 FB07
			4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 GA27
			GA30 HA17
			4B063 QA05 QA18 QA20 QQ48 QQ91
			QR32 QR90 QS15 QS34 QS40
			QX01
			4C084 AA13 AA17 MA01 NA13 NA14
			ZA812 ZB212